

B8

⑬ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑪ **DE 3034045 A 1**

⑤ Int. Cl. 3:
C 12 N 9/52
C 07 G 7/00
C 12 Q 1/38

⑳ Aktenzeichen: P 30 34 045.5
㉑ Anmeldetag: 10. 9. 80
㉒ Offenlegungstag: 22. 4. 82

Behördenbesitz

DE 3034045 A 1

㉓ Anmelder:
Boehringer Mannheim GmbH, 6800 Mannheim, DE

㉔ Erfinder:
Schrenk, Jürgen, Dr.rer.nat., 8120 Weilheim, DE;
Wunderwald, Peter, Dr.rer.nat., 8121 Haunshofen, DE

㉕ Endoproteinase-Lys-C aus Bakterien, Verfahren zu ihrer Gewinnung und Verwendung

DE 3034045 A 1

P a t e n t a n s p r ü c h e ---

1. Endoproteinase-Lys-C aus Bakterien, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß sie aus einer Kette vom Molekulargewicht 35 000 - 38 000 Dalton besteht, ein pH-Optimum bei pH 7,7 aufweist und durch Aprotinin gehemmt, durch α_2 - Makroglobulin, α_1 -Antitrypsin und Äthylendiamintetraessigsäure nicht gehemmt wird.
2. Verfahren zur Gewinnung der Endoproteinase-Lys-C von Anspruch 1, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man filtrierte oder nach üblichen Methoden vorgereinigte Kulturbrühe eines geeigneten Bakterienstammes über trägerfixierten α_2 -Makroglobulin-Metall-Komplex chromatographiert und das Enzym aus dem Filtrat gewinnt.
3. Verfahren nach Anspruch 2, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man in 0,01 - 0,1 M Puffer pH 6,5 - 9 chromatographiert.
4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man Kulturbrühe aus Lysobacterales-Züchtung verwendet.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 4, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man aus der filtrierten Kulturbrühe das Protein durch Ammonsulfat fällt, den Niederschlag nach erneutem Auflösen zwischen 1,3 und 3 M Ammonsulfat fraktioniert und die in diesem Bereich unlösliche Fraktion in Wasser auflöst und nach Dialyse mit Aceton zwischen 1,2 und 2,4 Vol. Aceton fraktioniert.

6. Verfahren nach Anspruch 5, d a d u r c h g e k e n n -
z e i c h n e t, daß man den Niederschlag der Aceton-Fraktio-
nierung nach Auflösung über einem Molekularsieb chromato-
graphiert und die zu Beginn der Chromatographie eluierte
Proteinfraktion der α_2 -Makroglobulin-Metall-Komplex-
Chromatographie unterwirft.
7. Verwendung der Endoproteinase-Lys-C von Anspruch 1 zur
Sequenzbestimmung von Proteinen und Peptiden.

PATENTANWÄLTE

3034045
DIPL.-ING. H. WEICKMANN, DIPL.-PHYS. DR. K. FINCKE
DIPL.-ING. F. A. WEICKMANN, DIPL.-CHEM. B. HUBER
DR. ING. H. LISKA

-3-

HRA

int. Nr. 2399

8000 MÜNCHEN 86, DEN 10. Sep. 1980

POSTFACH 860820

MÜHLSTRASSE 22, RUFNUMMER 98 39 21/22

BOEHRINGER MANNHEIM GMBH

Sandhofer Straße 112 - 132, 6800 Mannheim-Waldhof

Endoproteinase-Lys-C aus Bakterien, Verfahren zu
ihrer Gewinnung und Verwendung.

Für verschiedene Zwecke, insbesondere für die gezielte Spaltung von Proteinen und Peptiden, beispielsweise im Rahmen der Sequenzbestimmung, sind Endoproteinasen, die an einer bestimmten Stelle spalten, von technischem und wissenschaftlichem Interesse. So ist bereits eine am C-terminalen Ende von Lysin die Peptidbindung spaltende Endoproteinase aus Pilzen bekannt. Dieses Enzym ist jedoch schwierig zugänglich und steht daher nicht im gewünschten Ausmaß zur Verfügung. Nunmehr wurde ein Enzym der gleichen Spezifität in Bakterien gefunden, welches als Endoproteinase-Lys-C charakterisiert wird und sich von anderen bakteriellen Proteasen durch die Eigenschaften deutlich unterscheidet.

Die erfindungsgemäße neue Endoproteinase-Lys-C aus Bakterien ist dadurch gekennzeichnet, daß sie aus einer Kette von Molekulargewicht 35 000 - 38 000 Dalton besteht, ein pH-Optimum bei pH 7,7 aufweist und durch Aprotinin gehemmt, durch α_2 -Makroglobulin, α_1 -Antitrypsin und Äthylendiamintetraessigsäure nicht gehemmt wird.

Das erfindungsgemäße Enzym neigt unter nicht reduzierenden Bedingungen zur Aggregation, wobei bevorzugt Tetramere mit einem Molekulargewicht von etwa 150 000 D und Oktamere mit einem Molekulargewicht von etwa 300 000 D gebildet werden, die enzymatisch aktiv sind.

Das pH-Optimum des neuen Enzyms liegt, wie bereits erwähnt, bei pH 7,7, bestimmt bei 37° C nach der Azocoll-Methode.

In der Elektrofokussierung spaltet sich das Enzym in zahlreiche Banden auf, die sich über fast den gesamten pH-Bereich erstrecken. Dieses Verhalten läßt darauf schließen, daß es sich um ein Glycoprotein handelt; der isoelektrische Punkt des Enzyms ist daher nicht bestimmbar.

Wie bereits erwähnt, hemmen α_2 -Makroglobulin, α_1 -Antitrypsin und Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA) bis höchstens 10^{-2} M nicht. Benzamidin hemmt dagegen bei 2,5 mM etwa 50 %; durch Erhöhung der Benzamidinkonzentration lassen sich 70 % Hemmung erzielen. Eine vollständige Hemmung ergibt Aprotinin.

Die Substratspezifität des neuen Enzyms zeigt Tabelle 1. Seine spezifische Aktivität, gemessen mit Tosyl-glycyl-prolyl-lysyl-p-nitroanilid bei 25° C beträgt ca. 25 U/mg oder ca. 50 Azo-coll-Einheiten/mg Enzym bei 37° C.

Im Gegensatz zu der aus *Lysobacter* beschriebenen Proteinase II spaltet das erfindungsgemäße Enzym nicht aminoständig, sondern carboxyständig am Lysin. Die hohe Spezifität zeigt auch die geringe Zahl von Banden, die bei Gel-Chromatographie von mit diesem Enzym erhaltenen Fibrin-Spaltprodukten auftreten.

- 2 -
- 6 -

3034045

T a b e l l e 1

Substratspezifität von Endoproteinase Lys-C

Substrat	Abbau durch Endoproteinase Lys-C
Azocoll	+
Casein	+
Fibrinogen	+
Hämoglobin	+
TLME	++
Chromozym PL ^R	++
S 2251 ^R	++
Tos-Arg-Me	-
Chromozym TH ^R	-
BAEE	-
Leu-pNA	-
Lys-pNA	-
ATEE	-
B-Kette von Insulin	+

Abkürzungen

TLME	= Tosyl-lysyl-methylester
BAEE	= Benzoyl-arginyl-äthylester
ATEE	= Arginyl-tyrosyl-äthylester
Chromozym PL ^R	= Tosyl-glycyl-prolyl-lysyl-p-nitro- anilid
Chromozym TH ^R	= Tosyl-glycyl-prolyl-arginyl-p-nitro- anilid
S 2251 ^R	= Valyl-leucyl-lysyl-p-nitroanilid

3034045

Die Tabelle 2 zeigt die Unterschiede des erfindungsgemäßen Enzyms gegen bisher in Lysobacter gefundene Proteasen.

T a b e l l e 2

	<u>EC-Nummer</u>	<u>Molekular- gewicht</u>	<u>Reaktions- mechanismus</u>	<u>Spezifität</u>
α -lytic-proteinase	3.4.21.12	20 000 D	Serin-Protease	Carboxylgruppe neutra- ler Aminosäuren, bes. Alanin
β -lytic-protease	-----	19 000 D	Zn-Metallopro- teinase	Carboxylgruppe hydro- phober Aminosäuren, lysiert bakterielle Zellwände
AL-1 Proteinase I	3.4.99.29	9 000 D (Gel- filtration), 14 000 D (Sedimenta- tionsäquili- brum)	unbekannt	hydrophobe Aminosäuren, lysiert bakterielle Zellwände (besonders grampositive)
AL-1 Proteinase II	3.4.99.30	17 000 D	unbekannt	Aminogruppe von Lysin
Endoproteinase Lys-C	-----	36-38 000 D (red. SDS-Gel), ca. 35 000 D (Sephacryl S-300)	Serin-Protease	Carboxylgruppe von Lysin

Das erfindungsgemäße Enzym läßt sich aus den Kulturbrühen von Mikroorganismen, die dieses Enzym in ausreichender Menge bilden, insbesondere aus solchen der Ordnung Lysobacterales und hierunter vorzugsweise solchen der Familie Lysobacteraceae, z.B. der Gattung Lysobacter (auch Myxobacter genannt) nach üblichen Enzymreinigungsmethoden, wie Ammonsulfatfraktionierung, Acetonfraktionierung und Molekularsiebchromatographie von den meisten Verunreinigungen befreien. Die Abtrennung anderer Proteasen gelingt erfindungsgemäß durch Behandlung mit trägerfixiertem α_2 -Makroglobulin-Metallkomplex. Bei diesem, für Enzymreinigungen neuen Verfahrensschritt werden schwer zu entfernende Verunreinigungen, insbesondere aber die begleitenden Proteasen, abgetrennt, während die erfindungsgemäße Endoproteinase Lys-C in Lösung bleibt und aus dieser isoliert werden kann.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Gewinnung von Endoproteinase Lys-C ist daher dadurch gekennzeichnet, daß man eine filtrierte, oder nach an sich bekannten Methoden gereinigte Kulturbrühe eines geeigneten Bakterienstammes, über trägerfixiertem α_2 -Makroglobulin-Metall-Komplex chromatographiert, und das Enzym aus dem Filtrat gewinnt.

In dem oben erwähnten α_2 -Makroglobulin-Metall-Komplex besteht das Metall aus einem zweiwertigen Metall der Gruppe Zn, Co, Ni oder/und Cu. Die Verwendung dieses Komplexes und seine Herstellung ist in der gleichzeitig eingereichten deutschen Patentanmeldung P (int. Nr. 2380) näher beschrieben.

Wie bereits erwähnt, kann direkt von der Kulturbrühe ausgehend die erfindungsgemäße Behandlung mit trägerfixiertem α_2 -Makroglobulin-Metall-Komplex vorgenommen werden. Zweckmäßiger ist es jedoch, die Proteine vorher von anderen Substanzen abzutrennen und eine Vorfraktionierung durchzuführen.

Die Abtrennung der Proteine aus dem Kulturfiltrat erfolgt zweckmäßigerweise durch Fällung mit Ammonsulfat, obwohl auch

andere übliche Proteinfällungsmittel, welche die enzymatische Aktivität der darin enthaltenen, aktiven Proteine nicht beeinträchtigt, verwendet werden können. Bei Zusatz von Ammonsulfat gibt man dieses zweckmäßig bis zu einer Konzentration von 2,5 - 3,5 M, vorzugsweise 3 - 3,2 M zu. Der dabei gebildete Niederschlag wird abgetrennt, beispielsweise abfiltriert, und enthält die gesamte gesuchte Aktivität. Nach Auflösen mit Wasser und vorzugsweise Entfernung von restlichem Ammonsulfat durch Dialyse kann man die so erhaltene Lösung entweder der α_2 -Makroglobulin-Metall-Komplex-Chromatographie unterwerfen, oder einer weiteren Vorreinigung unterziehen.

Wird eine weitere Vorreinigung gewünscht, so führt man zweckmäßig eine Ammonsulfatfraktionierung durch, wobei die zwischen 2 und 3M Ammonsulfatkonzentration ausfallende Fraktion die gewünschte Aktivität enthält. Dabei wird zweckmäßig in einer ersten Stufe Ammonsulfat auf 0,7 - 1,3 M zugegeben, der Niederschlag abgetrennt und dann die Ammonsulfatkonzentration auf 3 M, vorzugsweise auf 2,25 - 2,32 M, erhöht, und der dabei erhaltene aktive Niederschlag in üblicher Weise abgetrennt und durch Dialyse von verbliebenem Ammonsulfat gereinigt.

Falls die so erhaltene Lösung nicht der α_2 -Makroglobulin-Metall-Komplex-Behandlung unterworfen wird, kann auch noch eine Acetonfraktionierung und eine Molekularsiebchromatographie vorgeschaltet werden. Im Falle einer Acetonfraktionierung fällt man durch Zusatz von 0,3 - 1,5 Vol., vorzugsweise 0,5 - 1,2 Vol. Aceton, trennt den Niederschlag ab und gibt weitere 1,2 Vol. Aceton zu, trennt den Niederschlag ab und löst ihn in Puffer pH 7,5 - 9 auf. Die Pufferkonzentration liegt zweckmäßig zwischen 0,01 und 0,05 M. Nach Dialyse zur Entfernung von restlichem Aceton und ggf. Einengung der erhaltenen Lösung kann über ein Molekularsieb, beispielsweise vernetztes Dextran, wie Sephadex-G-100 chromatographiert werden, wobei die gewünschte Aktivität zu Beginn aus der Säure eluiert wird, während die

bekannte AL-1 Proteinase I erst gegen Ende eluiert wird. Das Eluat wird, ggf. nach Konzentrierung, über trägerfixiertem α_2 -Makroglobulin-Metall-Komplex chromatographiert, wobei die gesuchte Endoproteinase-Lys-C durchläuft. Die Elution erfolgt vorzugsweise im pH-Bereich 7,0 - 8,5 bei einer Pufferkonzentration von 0,03 - 0,08 M. Die üblichen in diesem Bereich wirksamen Puffersubstanzen sind geeignet, bevorzugt werden Tris-Puffer, Hepes-Puffer und Phosphat-Puffer. Gute Ergebnisse werden bei pH 6,5 - 9 und 0,01 - 0,1 Puffergehalt erreicht. Das Eluat enthält reine Endoproteinase-Lys-C und Puffer und kann direkt lyophilisiert werden.

Das erfindungsgemäße neue Enzym ist insbesondere zur Sequenzbestimmung von Proteinen und Peptiden anwendbar. Auf Grund seiner sehr spezifischen Spaltungsaktivität läßt es sich auch therapeutisch einsetzen, beispielsweise bei Gerinnungsstörungen, beziehungsweise anderen Erkrankungen, bei denen die Spaltung von Proteinketten angestrebt wird.

Die folgenden Beispiele erläutern die Gewinnung des erfindungsgemäßen Enzyms und seine Bestimmung.

B e i s p i e l 1

Gewinnung von Endoproteinase-Lys-C aus *Lysobacter*
enzymogenes ssp. *enzymogenes* DSM 1895 (ATCC 27796)

Ausgangsmaterial: 206 Ltr. *Lysobacter*-Kulturfiltrat

206 Ltr. *Lysobacter*-Kulturfiltrat werden langsam mit festem Ammonsulfat auf 3 - 3,2 M ausgefällt. Der geringe flockige Niederschlag wird abfiltriert. Der Niederschlag auf den Filtern wird mit wenig dest. Wasser gelöst und mit festem Ammonsulfat auf 0,9 M (1,3 - 3 M) ausgefällt und zentrifugiert. Den Überstand fällt man nun weiter auf 2,25 - 2,32 M Ammonsulfat aus, und filtrierte oder zentrifugiert den Niederschlag, löst ihn mit

- 8 -
- m -

ca. 400 ml dest. Wasser und dialysiert gegen fließendes Leitungswasser.

Das Dialysat wird mit 0,5 - 1,2 Vol. -20° C kaltem Aceton versetzt und abzentrifugiert. Den Überstand (klar) versetzt man nun mit weiteren 1,2 Vol. (berechnet aus Anfangsvol.) Aceton, zentrifugiert den Niederschlag ab und löst ihn so konzentriert wie möglich mit 0,025 M Tris, pH 9 auf und dialysiert gegen 10 Ltr. desselben Puffers.

Das Dialysat wird auf eine Sephadex-G-100-Säule aufgetragen mit folgenden Abmessungen:

Ø 5 cm, Länge 150 cm, Säulenvol. ca. 2,9 Ltr.

Die Säule wird mit 0,025 M Tris, pH 9,0 äquilibriert und nach dem Aufziehen mit demselben Puffer nachgewaschen.

Lysobacter-Protease wird zu Beginn eluiert.

Die Eluate werden mit festem Ammonsulfat auf 3,2 M ausgefällt und zentrifugiert. Der konzentriert aufgenommene Niederschlag wird gegen 0,05 M Tris pH 8,0 dialysiert.

Alpha₂-Makroglobulin-Zn-Komplex, kovalent an Agarose gebunden, wird zur Weiterreinigung verwendet. 110 ml dieses Trägermaterials werden in 3 cm Ø Säule, Länge 17,5 cm, eingefüllt und mit 0,05 M Tris, pH 8,0 gewaschen, bis sich kein Protein im Durchlauf befindet.

Nun wird das Dialysat aufgezogen und mit 0,05 M Tris, pH 8,0 nachgewaschen. Proteinase-Lys-C läuft durch.

Der Durchlauf wird gegen 0,05 M Glycin, pH 8,0 dialysiert und auf 0,4 mg/ml mit demselben Puffer verdünnt und lyophilisiert.

- 9 -

3034045

- 12 -

Gesamt-Ausbeute: ca. 50 - 140 mg Protein
6 - 23 U/mg Proteinase Lys-C
Chromozym TH Aktivität < 0,2 %

Beispiel 2

Bestimmung der Endoproteinase Lys-C

Herstellung der Lösungen:

1. 0,025 M Tris, 0,001 M EDTA, pH 7,7
0,303 g Tris, 37,2 mg EDTA werden in ca. 80 ml bidest.
Wasser gelöst und pH mit 2 N HCl auf 7,7 eingestellt
und auf 100 ml aufgefüllt.
2. Chromozym-PL (14µM/ml)
9 mg Chromozym-PL in 1 ml bidest. H₂O auflösen.
3. Endoproteinase-Lys-C-Lösung
10 mg Lyophilisat in 1 ml bidest. H₂O lösen. Vor Gebrauch
1:100 mit Lösung 1 verdünnen.

Ausführung: 405 nm 1 cm Halbmikroküvette
25° C Testvolumen 1,07 ml

- 10 -
- 13 -

3034045

In Küvette pipettieren:	
Lösung 1	1 ml
Lösung 2	0,05 ml
mischen, ca. 2 min. bei 25° C temperieren.	
Probelösung 3	0,02 ml
mischen, aus linearer Phase nach ca. 5 min. $\Delta E/\text{min}$ berechnen.	

Berechnung:

$$\frac{\Delta E/\text{min} \times 1,07}{10,4 \times 0,02} \cdot 100 = \text{U/ml Endoproteinase-Lys-C}$$